

Arabinoxylane과 PSP의 면역세포 활성화 효과

채수연¹ · 신성해¹ · 배만종² · 박미현³ · 송미경³ · 황성주³ · 이성태^{1*}

¹순천대학교 생물학과

²대구한의대학교 한방식품과학부

³이롬라이프 생명과학연구원

Effect of Arabinoxylane and PSP on Activation of Immune Cells

Su-Yeon Chae¹, Sung-Hae Shin¹, Man-Jong Bae², Mi-Hyun Park³,
Mi-Kyung Song³, Sung-Ju Hwang³ and Sung-Tae Yee^{1*}

¹Dept. of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Dept. of Oriental Medicine Biofood Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

³EromLife R&D Center, EromLife Co. Ltd, Seoul 135-010, Korea

Abstract

The objective of the current study was to determine the effects of arabinoxylane and PSP on mouse splenocytes, T cells, B cells and macrophages *in vitro*. Arabinoxylane and PSP directly induced the proliferation of spleen cells in a dose-dependent manner and increased IFN- γ synthesis. Especially, PSP induced IL-2, IL-4 and IL-10 production. Both arabinoxylane and PSP increased PFC (plaque forming cell) and RFC (rosette forming cell) formation. Arabinoxylane was not induced the proliferation of T cells, but PSP directly induced the proliferation of T cells in a high dose. Arabinoxylane and PSP increased the proliferation of B cells and the phagocytic effects of macrophage. When arabinoxylane and PSP were used in macrophage cell line stimulation, there was a marked induction of NO synthesis in a dose-dependent and an increased TNF- α and IL-6 synthesis. Especially, PSP also induced IL-1 β production. When arabinoxylane and PSP treated in macrophage cell line, there was induction of MHC class II expression. These results suggest that the capacity of arabinoxylane and PSP seem to act as a potent immunomodulator causing augmentation of immune cell activity, and with the absence of notable side-effects, arabinoxylane and PSP could be used as a biological response modifier having possible therapeutic effects against immunological disorders.

Key words: arabinoxylane, polysaccharide-peptide (PSP), cytokines, nitric oxide, MHC class II

서 론

식품기능이란 용어는 일본 문부성 특정연구과제인 “식품기능의 계통적 해석과 전개(1984년~1986년)”에서 처음으로 등장하였고, 그 후에 일본 문부성 특정연구과제로 “식품의 생체조절기능 해석(1988년~1990년)”에 대한 연구가 실시되고, 1991년 9월 영양개선법의 시행규칙 일부를 개정하여 식품의 생체조절기능을 상품에 표시할 수 있도록 특정보건식품의 허가제도가 시행되었다. 식품기능이란 용어는 지금까지 식품의 특성이라고 생각한 영양기능과 감각기능에 대해 식품의 생체조절기능을 강조한 것으로, 기능성 식품(functional foods)이라는 개념이 도입되었다. 한편 미국에서도 국립 암연구소(NCI)에서 1990년부터 암을 예방할 수 있는 식품을 개발하기 위한 연구를 시작하면서 designer foods라는 용어를 사용하면서, 생체기능을 조절할 수 있는 식품에 대한

연구가 본격적으로 시작되었다(1,2).

최근에는 일부 식품과 생약 성분들의 영양생리 기능 및 약리 기능이 명확히 밝혀지면서, 성인병의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 증명되고 있고, 항암성을 가지는 식용식품의 성분들이 이미 제품화되고 있다. 즉, 천연식품자원을 대상으로 인체의 조절작용과 방어작용을 활성화시키는 성분을 탐색하여 치료제 및 예방제를 개발하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 일본은 기능성 식품을 21세기의 식품 산업계를 주도할 품목으로 예시하고 있으며, 미국도 새로운 산업으로 designer foods의 가능성을 인식하고 있다. 따라서 이와 같은 국내외의 상황을 고려할 때, 유용천연자원 개발은 국내의 환경에 맞게 산학연의 긴밀한 협동연구로 새로운 소재의 탐색과 함께, 새로운 제품개발이 이루어져야 할 것으로 기대된다.

Arabinoxylane은 미강(쌀겨)에서 추출한 헤미셀룰로즈

*Corresponding author. E-mail: sungtae@suncheon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3618, Fax: 82-61-750-3608

(수용성 식이섬유 성분)를 표고버섯 균사체의 특수 효소로 분해하여 만든 식물성 생리활성 영양소로, 미국 UCLA 대학의 Mamdooh Ghoneum 박사가 개발한 새로운 면역활성물질이다. Arabinoxylane은 면역세포 중 암세포와 최전선에서 싸우는 NK 세포를 활성화시켜 암세포를 파괴하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(3-5). 그리고, PSP(polysaccharide-peptide)는 담자균류의 일종인 운지버섯 중에서 Cov-1이라는 특수 균종의 균사체에서 추출, 정제하여 얻은 단백다당체 성분으로 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다(6-8). 따라서, 본 연구는 국내로 수입되어 기능성 식품의 원재료로 사용되고 있는 arabinoxylane과 PSP의 면역세포 활성화능력을 비교 검증하였다.

재료 및 방법

실험 동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 특정병원체부재(specific pathogen free) Balb/c 생쥐를 공급받아 실험동물 사육장에서 폴리카보네이트 사육상자(18×20 cm)당 6개체의 밀도를 유지하며 사용하였다. 이들 생쥐는 2주일간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 8~12주 사이의 생쥐를 실험에 사용하였다.

실험 재료

실험에 사용한 시료인 arabinoxylane과 PSP(polysaccharide-peptide)는 (주)이롭라이프에서 제공받아 사용하였다.

사용 시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640와 배지에 첨가하는 항생제(antibiotic-antimycotic), FCS(fetal calf serum)는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, 2-ME(2-mercaptoethanol), sodium bicarbonate(NaHCO₃), N-1-naphthylethylen diamine와 Sulfanilamide는 Sigma(USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약(Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)은 Promega(USA) 제품을 사용하였고, cytokine 측정에 필요한 항체와, 세포표면 단백질 분자를 염색하는 각종 항체는 Pharmingen(USA) 제품을 사용하였다(9).

비장세포 분리법

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 먼저 생쥐의 비장을 분리한 다음, 핀셋이나 메쉬를 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 세척한 다음, 5×10⁶ cells/mL 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well 당 100 μL씩 첨가하였다. 이때, 실험 재료를 농도별로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 일정시간 배양한 다음, Cell Titer 96 solution(Promega, USA)을 이용하여 세포증식을

측정하였다(10).

Plaque forming cell(PFC)

항체 생산 세포의 검색은 Cunningham방법(11)을 이용하였고, 시료투여는 10일간 행하고 6일째에 SRBC를 1×10⁹ cells/mL이 되도록 조정하여 생쥐의 복강에 0.2 mL 주사하였다. 4일 후 비장을 적출하여 세포 부유액으로 만들어 3회 세척 후, 1×10⁶ cells/mL이 되도록 조정된 비장세포 200 μL와 10% SRBC 36 μL, complement 21 μL, 그리고 5% FCS-HBSS액 143 μL를 혼합하여, 자체 제작한 Cunningham chamber에 넣어 37°C incubator에서 1시간 배양하면 항체생산세포 주위에 적혈구가 용해된 투명한 용혈반(plaque)이 생성된다. 이때의 용혈반수를 세어 항체 생산 세포수를 산정 하였다.

Rosette forming cell(RFC)

비장세포의 Rosette형성세포의 검사는 “Method in immunology”(12)에서 기술한 방법에 따라 행하였다. 즉, 비장세포 부유액(2×10⁷ cells/mL) 200 μL와 1% SRBC 부유액 200 μL를 시험관에 넣고 혼합하여 1,700 rpm에서 원심 분리한 후, 이것을 다시 부유시켜 혈구계산반에 주입하여 RFC를 현미경으로 관찰하였다. 현미경상에서 비장세포에 SRBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 공식에 준하여 계산하였다.

$$\text{RFC/mL in rosette mixture/Viability} \times 10 = \text{RFC}/10^6 \text{ viable nucleated cells}$$

T세포 분리법

분리한 생쥐의 비장세포를 10% FCS·RPMI 1640배지 1 mL에 희석하여 Nylon wool column에 넣고 37°C, 5%CO₂ incubator에 60분간 배양한 후, Nylon wool column을 37°C로 미리 데워진 배지로 세척하여 비부착성인 T세포만을 순수 분리하여 사용하였다(13).

B세포 분리법

B세포는 비장세포 부유액을 T세포 특이적 항원인 Thy 1.2에 대한 항체와, 토끼 보체로 처리하여 T세포를 제거하고, Sephadex G-10 column을 이용하여 나머지 부착세포를 제거하여 분리한다(9). 분리한 B세포를 실험 재료와 같이 배양한 후, 증식정도는 Cell Titer 96 solution을 이용하여 측정하였다.

세포증식 측정법

세포증식 측정은 Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, USA)를 사용하였으며, 세포 배양액 100 μL에 Cell titer 용액을 15 μL씩 첨가하여 4~8시간동안 배양한 다음 Microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 490 nm에서 O.D.값을 측정하여 증식정도를 측정하였다.

사이토카인 측정법

각종 사이토카인(IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α,

IFN- γ) 농도 측정은 ELISA법을 이용하였다. 즉, flat-bottomed microwell plate에 goat anti-mouse cytokine 1차 항체를 coating buffer를 이용하여 4°C에서 overnight incubation한 후, 3% BSA용액으로 2시간 동안 상온에서 blocking하였다. 실험에서 채취한 배양 상층액을, plate에 각각 넣어서, 37°C에서 2시간 incubation시킨 후, biotinylated anti-cytokine 2차 항체를 첨가하였다. 그리고, avidin-conjugated alkaline phosphate를 적당량 가하고, 37°C에서 2시간 incubation시키고, 기질로 *p*-nitrophenyl phosphate를 넣은 후 Microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve를 이용하여 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 환산하여 나타내었다(14).

탐식능 측정

탐식능 측정은 小松 등의 방법(15)에 따라 행하였다. CP (*Candida parapsilosis*) 부유액 (8×10^3 cells/mL) 50 μL 와 식세포 부유액 (8×10^4 cells/mL) 50 μL , 그리고 5% 동계 생쥐 혈청 100 μL 를 V-bottomed microtitre tray에 주입하여 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 3시간 배양하였다. 배양 후 그중 50 μL 를 취해서 Sabouraud's dextrose agar 배지에 옮겨 35°C에서 2일간 배양하여 살아있는 CP colony수를 세어 식세포에 의해 탐식된 CP의 생균수를 표시하였다.

일산화질소 측정

안정된 NO 산화물인 NO² (nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상층액을 flat bottom 96well plate에 100 μL 씩 넣고 여기에 Griess시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1 : 1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 32 μM 에서부터 0.25 μM 까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다(16).

주조직적합 복합체 발현 측정

실험재료를 첨가하여 대식세포주(RAW264.7)를 24시간 배양한 다음에 대식세포를 회수하였다. 대식세포 부유액을 PBS(0.5% BSA와 0.1% sodium azide 포함)에 1×10^7 cells/mL의 농도로 부유시킨 후, 50 μL 의 세포 부유액에 적당량의 FITC로 표지된 항체(anti-MHC class II)를 가하여 4°C에서 30분간 두었다. 염색이 완료된 세포를 PBS로 1회 세척한 후 flow cytometry를 사용해 분석하였다. 별도의 세포 부유액에 FITC-hamster IgG(Serotec)를 첨가하여 negative control로 사용하였으며, 생존 세포만을 분석하기 위해 forward scatter/side scatter gating을 통해 죽은 세포를 배제하였다(9).

결 과

비장세포의 증식

비장세포의 증식반응을 알아보기 위하여, 분리한 비장세

포를 5×10^5 cells/well 넣고 시료를 농도별로 첨가하여 2일 또는 3일간 배양하여 증식정도를 비교하였다. 그 결과, Fig. 1과 같이 B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 LPS(lipopolysaccharide)와 T세포의 증식을 특이적으로 유도하는 Con A(concanavalin A)에 의해서 비장세포는 농도에 의존적으로 2일째 최대 증식반응을 나타내었고, 3일째 약간 감소하는 것으로 나타났다. 그리고, 배양 2일째는 arabinoxylane과 PSP를 첨가하였을 때도 농도 의존적으로 비장세포의 증식반응이 나타났다. 이때 arabinoxylane과 PSP의 증식반응 정도는 서로 비슷하였지만, 반응 3일째는 arabinoxylane의 경우에 2일째 반응보다 낮게 나타났지만, PSP는 2일째보다 더 높은 반응이 나타났다. 즉, 3일째까지 계속해서 비장세포의 증식을 유도하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 arabinoxylane과 PSP 모두가 비장세포의 증식반응을 유도하였으며, 최대농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 최대 증식반응이 일어났다. 그리고, PSP는 arabinoxylane보다 지속적인 증식반응을 유도하는 것으로 나타났다.

비장세포의 사이토카인 생산

비장세포의 증식반응이 일어나면, 증식하는 세포는 여러 가지 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비한다. 즉, 비장세포의 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알면 사이토카인이 매개하는 면역반응과 증식하는 세포의 종류를 구분할 수 있다. 따라서, 비장세포 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보았다.

분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여, 분리한 비장세포를 5×10^6 cells/well 넣고, 각 성분의 최대 증식반응을 유도하는 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가하여 24시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액에 포함되

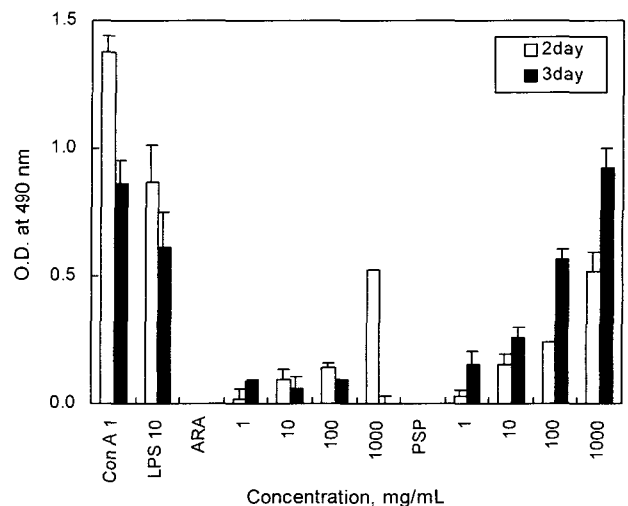


Fig. 1. Effects of arabinoxylane and PSP on the proliferation of spleen cells.

Spleen cells (5×10^5 cells/well) were stimulated for 2 or 3 days, respectively, with various doses of arabinoxylane and PSP and assayed for proliferation.

Table 1. Effects of arabinoxylane and PSP on the production of various cytokines

Conditions	Cytokines, pg/mL			
	IL-2	IL-4	IL-10	IFN- γ
Control	<10	<10	<10	169.8 \pm 11.0
ConA (1 μ g/mL)	4844.5 \pm 134.4	43.8 \pm 1.8	<10	17885.3 \pm 257.7
LPS(10 μ g/mL)	<10	<10	<10	502.3 \pm 7.4
Arabinoxylane	<10	<10	<10	242.3 \pm 42.1
PSP	49.0 \pm 3.5	57.3 \pm 14.6	78.8 \pm 2.8	1677.3 \pm 155.2

Spleen cells (5×10^6 cells/well) were stimulated with arabinoxylane (1,000 μ g/mL) and PSP (1,000 μ g/mL) for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined as described under Materials and Methods. The results are expressed as means \pm SD of triplicate assays.

어 있는 사이토카인의 농도와 종류는 ELISA로 측정하였다. Table 1에 나타난 것과 같이, 비장세포 중에서 B세포의 증식을 유도하는 LPS는 IFN- γ 분비만을 유도하였고, T세포의 증식을 유도하는 Con A는 비교적 많은 양의 IL-2, IL-4, IFN- γ 분비를 유도하였다. 그리고, arabinoxylane은 LPS와 같이 IFN- γ 분비만을 유도하였지만, PSP는 Con A와 같이 IL-2, IL-4, IFN- γ 분비를 유도하였다. 그리고, IL-10의 분비도 유도하였다. 무처리 대조군에 비해, IFN- γ 분비의 경우에 arabinoxylane은 약 1.4배, PSP는 약 10배 정도의 많은 양을 유도하였다. PSP는 Con A로 자극하였을 때보다 적지만 대조군에 비해 많은 양의 IL-2 분비를 유도하였고, 비슷한 양의 IL-4 분비를 유도하였다. 실험에서 분비되는 IL-2는 적응면역반응에 관여하는 보조 T세포와 살세포 T세포의 증식을 유도하는 역할을 하며(17), IL-4는 역시 적응면역반응에 관여하는 B세포의 항체 생성을 유도하는데 필요한 사이토카인으로 알려져 있다(18). 그리고, IFN- γ 는 내재면역반응에 관여하는 대식세포를 활성화시키는 중요한 역할을 하는 사이토카인이다(19).

이상의 결과로 arabinoxylane과 PSP는 비장세포를 직접 자극하여 IFN- γ 분비를 유도하였으며, 특히 PSP는 IFN- γ 뿐만 아니라 IL-2, IL-4, IL-10 분비도 유도하는 것으로 나타났다. 그리고, 분비를 유도하는 사이토카인의 종류를 비교하였을 때, arabinoxylane은 비장세포 중에서 B세포를, PSP는 B세포와 T세포를 자극하여 증식을 유도하는 것으로 생각된다.

PFC 및 RFC 형성능

용혈반 형성은 면역적혈구로 면역시킨 생쥐의 비장세포를 면역적혈구와 보체를 혼합하여 배양하게 되면, 항체 생산세포(B세포)는 면역글로불린을 방출하게 된다. 방출된 면역글로불린은 적혈구에 결합하여 적혈구가 용혈됨으로서 plaque가 나타난다(20). 한편 Rosette 형성은 T세포에 의한 것으로, 활성화된 T세포는 4°C에서 면역적혈구와 Rosette를 형성하게 된다(21,22). 면역적혈구로 면역시킨 생쥐에 arabinoxylane과 PSP를 10일간 경구 투여한 후 비장세포와 생쥐복강 상재성 대식세포를 회수하여 각 시료가 항체생성에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 2와 같다.

비장세포의 PFC형성을 통한 항체 생성능은 대조군(245 \pm 23/ 5×10^6 cells)에 비하여 PSP 투여 그룹(272 \pm 23/ 5×10^6

Table 2. Effects of treatment samples on the plague forming and rosette forming cells after the anti-SRBC response Balb/c

Groups	Number of PFC/ 5×10^6 spleen cells	Number of RFC/ 1×10^7 spleen cells
Control	245 \pm 20	102 \pm 14
PSP	272 \pm 23	125 \pm 10
Arabinoxylane	281 \pm 24	133 \pm 14

The sample were orally fed to Balb/c for 10 days. The mice were immunized with SRBC at 4 days before assay. The results are expressed as means \pm SD. Control group: physiological salt solution 0.4 mL/1 day/mouse. PSP group: PSP 1.5 mg/1 day/mouse. ARA group: arabinoxylane 1.5 mg/1 day/mouse.

cells)은 11%, arabinoxylane 투여군(281 \pm 24/ 5×10^6 cells)은 14% 항체 생성을 증강하는 경향을 보였다. 또한 비장세포에 Rosette형성을 관찰한 결과는 대조군은 비장세포 1×10^7 당 102 \pm 14개의 Rosette를 형성하였으며, PSP 투여군은 125 \pm 10개로 9%, arabinoxylane 투여군은 133 \pm 14개로 30% 대조군에 비하여 증강된 유의성($p < 0.05$)을 나타냈다.

이상의 결과로 볼 때 arabinoxylane과 PSP는 B세포 활성화, T세포 증식 및 PFC의 면역세포 활성화에 영향을 주고 있음을 확인하였으며 arabinoxylane이 PSP보다 항체 생성능, T세포 증식능이 다소 우수한 것으로 나타났다.

T세포의 증식

위 실험에서 두 가지 성분이 모두 비장세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이때, 증식하는 비장세포는 T세포 또는 B세포 중에 하나일 가능성이 높다. 따라서, 비장세포에서 T세포만을 따로 분리하여 두 가지 성분을 첨가한 후에 직접적으로 증식반응을 유도하는지를 검색하였다.

Nylon wool을 이용하여, 비장세포 중에서 부착성을 가진 B세포와 대식세포를 제거한 다음, 순수한 T세포만을 분리하여 3×10^5 cells/well 넣고, 각 성분을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하여 증식반응을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 것과 같이, 분리된 T세포는 LPS와 Con A에 대해 증식반응을 나타내지 않는 것으로 보아서 순수하게 분리된 것을 알 수 있었다. 이렇게 순수하게 분리된 T세포에 대해 두 가지 성분 모두 비장세포와 같은 정도의 증식반응을 유도하지는 않는 것으로 나타났다. 그러나, PSP의 경우 고농도(1,000 μ g/mL)에서 약한 증식반응을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 결

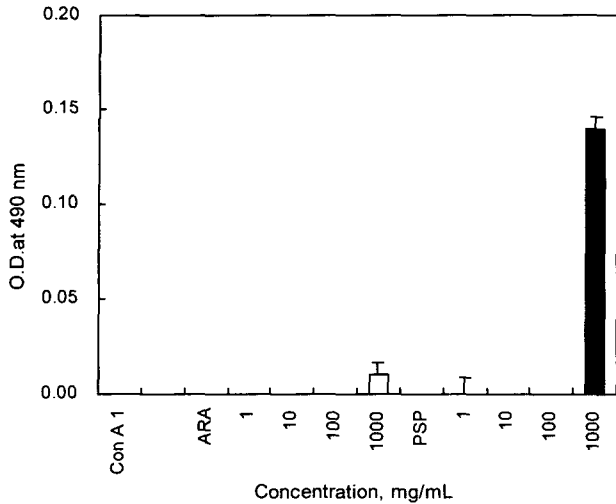


Fig. 2. Effects of arabinoxylane and PSP on the proliferation of splenic T cells.

Purified T cells (3×10^5 cells/well) were stimulated for 3 days, respectively, with various doses of arabinoxylane and assayed for proliferation. Spleen cells from Balb/c mice were passed through nylon wool column. The effluent cells were used as purified T cells for proliferation assay.

과는 비장세포에서 분비되는 사이토카인의 종류를 확인하고 예상한 것과 일치하는 것으로 생각된다. 즉, arabinoxylane은 순수 분리한 T세포의 증식반응을 유도하지 못하였지만, 고농도의 PSP는 비장세포의 증식반응보다 약하지만, 유의한 증식반응을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

B세포의 증식

두 가지 성분이 모두 비장세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났지만, T세포에 대해 고농도의 PSP만이 증식반응을 유도하였다. 따라서, 증식하는 비장세포는 B세포일 가능성이 높기 때문에, 이번에는 B세포만을 단독으로 분리하여 두 가지 성분이 B세포의 증식을 유도하는지를 검색하였다.

T세포만이 가지고 있는 세포표면 특이 단백질인 Thy 1.2 항원에 대한 항체와 보체를 이용하여 T세포를 제거하고 나머지 부착성 세포들을 G-10 sephadex를 이용하여 제거한 다음, 순수한 B세포만을 분리하였다. 분리한 B세포를 3×10^5 cells/well 넣고, 각 성분을 농도별로 첨가하여 2일 또는 3일간 배양하여 증식반응을 측정하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이, Con A에 의해서는 증식반응이 유도되지 않고, LPS에 의해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 순수하게 분리된 것을 알 수 있었다. PSP가 반응 2일째와 3일째에 농도 의존적으로 높은 증식반응을 유도하였지만, arabinoxylane은 상대적으로 낮은 증식반응을 유도하는 것으로 나타났다. 즉, PSP는 지속적으로 증식반응을 유도하는 것으로 생각되었고, arabinoxylane의 경우에 비장세포의 증식반응보다 낮은 것은 비장에 있는 B세포 이외의 다른 세포들의 도움이 증식반응에 필요하기 때문인 것으로 생각된다.

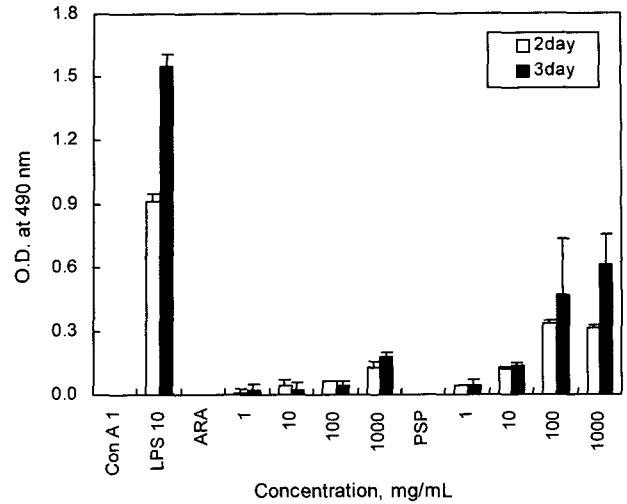


Fig. 3. Effects of arabinoxylane and PSP on the proliferation of splenic B cells.

Purified B cells (3×10^5 cells/well) were stimulated for 2 or 3 days, respectively, with various doses of arabinoxylane and assayed for proliferation. Spleen cells from Balb/c mice were treated anti-Thy1.2 mAb, rabbit complement and passed through G-10 sephadex column. The effluent cells were used as purified B cells for proliferation assay.

이상의 결과로, arabinoxylane과 PSP는 비장세포 중에서 특히 B세포의 증식을 유도하며, PSP는 B세포 이외에 T세포의 증식도 유도하는 것으로 나타났다.

대식세포의 탐식작용

Fig. 4는 생쥐의 복강에서 얻은 복강 대식세포가 *Candida parapsilosis*에 대한 탐식작용을 나타낸 결과이다. 대조군의 탐식능이 $47 \pm 6\%$ 에 비해 arabinoxylane 투여군 $69 \pm 7\%$, PSP 투여군 $65 \pm 5\%$ 로 탐식작용이 유의하게 증가하는 경향을 보였다.

탐식능 실험에 사용된 *Candida*는 *Aspergillus*, *Actino-*

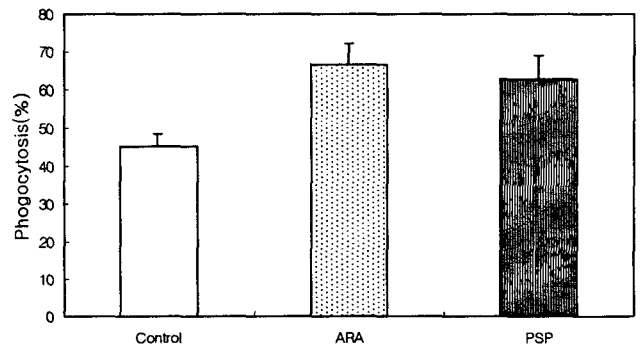


Fig. 4. Effects of treatment samples on phagocytic activity of peritoneal exudate cells.

The sample were orally fed to Balb/c for 10 days. Phagocytic activities of peritoneal macrophages were determined as described under Materials and Methods. The values represent the mean \pm SD of 6 mice.

Control group: physiological salt solution 0.4 mL/1 day/mouse, PSP group: PSP 1.5 mg/1 day/mouse, ARA group: arabinoxylane 1.5 mg/1 day/mouse.

myces 등과 같은 상재 비병원성 진균으로서 건강인에게는 병원성을 나타내지 않지만 신생아, 면역결핍증 환자, 면역억제 요법을 받은 사람, 백혈병이나 악성 임파종의 환자 등 숙주측의 면역능저하 또는 이상이 있는 경우 가끔 심한 감염을 초래하는 것으로 알려져 있다(23).

일산화질소 생산

대식세포는 박테리아와 같은 항원이 침입하였을 때, 일차적인 면역반응을 담당하는 세포로서, 우선 침입한 박테리아를 잡아먹는 식세포 작용을 한다. 이때, 잡아먹힌 박테리아는 금방 죽는 것이 아니라 대식세포 내 살균작용에 의해 죽고 분해된다. 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 최근에 밝혀진 것으로 일산화질소(nitric oxide)가 있다(16). 따라서, 두 가지 성분이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다.

대식세포주(RAW264.7)를 5×10^4 cells/well 넣고, 각 성분을 농도별로 첨가하여 2일간 배양한 다음, 배양 상층액을 얻어 상층액 중에 포함된 일산화질소의 산화된 형태인 NO_2^- 의 농도를 Griess반응을 이용하여 측정하였다. Fig. 5에 나타난 것과 같이, arabinoxylane과 PSP를 첨가하였을 때 농도의존적으로 무처리 대조군에 비해 현저히 많은 양의 일산화질소를 생산하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로, 두 가지 성분 모두 대식세포를 활성화시켜 일산화질소 생산을 직접적으로 유도하는 것으로 생각된다.

대식세포의 사이토카인 생산

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. 특히, TNF- α

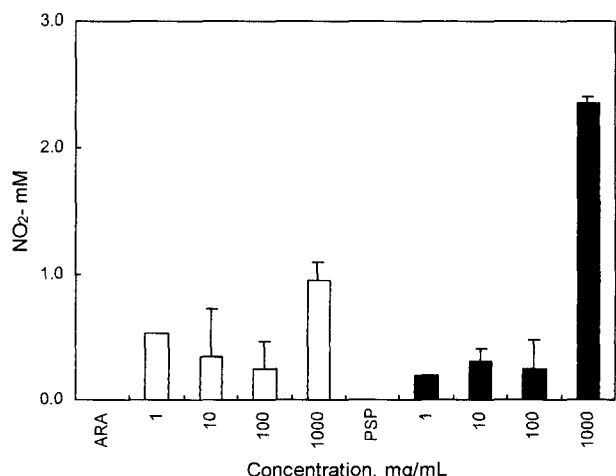


Fig. 5. Effects of arabinoxylane and PSP on the production of nitric oxide.

RAW264.7 cells (5×10^4 cells/well) were cultured with various concentrations of arabinoxylane and PSP for the production of nitric oxide. After 48 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under Materials and Methods.

는 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴하는 사이토카인이고(24), IL-1 β 는 국소 염증반응을 매개하며 혈관 내피세포에 작용하여 백혈구의 부착을 매개하는 표면분자의 발현을 증가시키는 사이토카인이다(25). 그리고, IL-6는 간세포가 피브리노겐과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 활성화시키는 B세포 성장인자로 작용한다(26). 따라서, 두 가지 성분이 대식세포를 활성화시켜 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다.

분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여, 배양한 대식세포주를 5×10^5 cells/well 넣고, 각 성분의 최대 증식반응을 유도하는 농도인 1,000 μ g/mL을 첨가하여 24시간 배양한 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액에 포함되어 있는 사이토카인의 농도와 종류는 ELISA로 측정하였다. Table 3에 나타난 것과 같이, 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS와 IFN- γ 에 의해서 IL-6와 TNF- α 생산량이 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 그리고, 두 가지 성분 모두 무처리 대조군에 비해 많은 양의 IL-6와 TNF- α 생산을 유도하는 것으로 나타났다. 특히, PSP는 대조군에 비해 IL-6는 약 67배, TNF- α 는 약 15배정도 많은 양을 생산하도록 유도하였으며, arabinoxylane의 경우에는 대조군에 비해 IL-6는 약 9배, TNF- α 는 약 3.5배정도 많은 양을 생산하였다. 이러한 대식세포의 사이토카인 생산량은 강력한 대식세포 활성화물질인 LPS로 유도된 양보다 많은 것으로 나타났다. 그리고, PSP는 arabinoxylane이 유도하지 못하는 IL-1 β 의 생산도 유도하였다.

이상의 결과로, 두 가지 성분 모두 대식세포를 강력하게 활성화시켜 많은 양의 IL-6와 TNF- α 생산을 유도하였으며, 특히 PSP는 IL-1 β 의 생산도 유도하는 것으로 나타났다.

대식세포의 주요조직항 복합체 II(MHC Class II) 발현

대식세포의 또 다른 기능은 식세포 작용으로 잡아먹은 항원을 세포성 면역을 담당하는 T세포에게 전달하는 항원제시 세포 기능이다. 이때, 항원을 전달할 때는 항원단독으로 전달할 수 없고, 주요조직항 복합체 II라고 하는 대식세포 표면

Table 3. Effects of arabinoxylane and PSP on the production of cytokines

Conditions	Cytokines, pg/mL		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Control	<10	20.3 \pm 4.7	332.5 \pm 70.7
LPS (10 μ g/mL)	<10	1,283.0 \pm 37.7	1,945.0 \pm 53.03
IFN- γ (1 ng/mL)	<10	170.3 \pm 4.71	595.0 \pm 88.4
Arabinoxylane	<10	173.7 \pm 14.1	1,182.5 \pm 106.1
PSP	144.9 \pm 2.0	1,340.3 \pm 9.43	4,897.5 \pm 424.3

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with arabinoxylane (1,000 μ g/mL) and PSP (1,000 μ g/mL) for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined as described under Materials and Methods. The results are expressed as means \pm SD of triplicate assays.

에 발현하는 단백질과 결합시켜서 전달한다. 대식세포의 주조직적합 복합체 II는 활성화되지 않았을 때는 세포 표면에 적은 양이 발현되지만, 활성화되면 발현되는 양이 현저히 증가하여, T세포에 많은 양의 항원을 전달하여 T세포를 활성화시켜 적응면역반응을 유도한다(27). 따라서, 두 가지 성분이 주조직적합 복합체 II의 대식세포 표면 발현에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였다.

발현되는 주조직적합 복합체 II의 양을 알아보기 위하여, 배양한 대식세포주를 5×10^5 cells/well 넣고, 각 성분의 최대 증식반응을 유도하는 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 을 첨가하여 24시간 배양하여 상층액을 버리고 배양세포를 회수하였다. 회수한 세포에 anti-MHC class II 항체를 이용하여 염색한 다음, 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 발현정도를 분석하였다. Fig. 6에서 나타난 것과 같이, 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS와 IFN- γ 에 의해서 주조직적합 복합체 II의 세포 표면 발현량이 증가하였다. 그리고, 두 가지 성분 모두 주조직적합 복합체 II의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것으로 나타났다. 발현 정도는 PSP가 arabinoxylane보다 발현량이 많은 것으로 나타났고, PSP는 강력한 대식세포 활성화 물질인 LPS와 IFN- γ 보다 많은 양의 주조직적합 복합체 II의 발현을 유도하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로, 두 가지 성분 모두가 대식세포를 활성화시켜 대식세포 표면의 주조직적합 복합체 II의 발현 양을 증가

시키는 것으로 나타났다.

고 찰

최근, 급속한 고도성장과 더불어 발생한 성인병, 만성질환, 스트레스성 질환 등 소위 현대병에 위기를 느끼면서, 항상 건강에 대한 관심 속에 살아가고 있는 실정이다. 이러한 관점에서 최근 식품에서 생체조절기능을 갖고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 기능성 식품이라고 하는 연구영역의 개념이 주목을 끌게 되었다. 면역강화 및 조절기능을 갖는 소재는 동물, 식물, 고등균류 및 미생물체 등에 이르기까지 광범위하게 탐색 확인되고 있으며 고등균류에서는 단백질, 식물체에서는 다당류 및 폴리페놀류 등이 효능면에서 뛰어난 성분들이 많음이 밝혀지고 있다.

AHCC(active hexose correlated compound)는 담자균의 균사체 배양 추출물 중에서 얻은 다당류를 총칭하는 것으로 Matsushita 등(28)은 AHCC를 이용해서 동물모델 면역반응 실험에서 수명연장효과와 대식세포 활성화를 확인하였다. 水島(29)는 항암제 부작용에 대한 경감작용, 岩本(30)은 AHCC의 투여량을 1일 3g에서 6g으로 증량함에 따라서 IPA: 1,568 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IPA: 500 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증량 표식인자가 저하됨을 확인하였다. 또 다른 BRM(biological response modifiers)으로 Letinan, PSK, *Lentinus edodes mycelia* 등이 이용되고

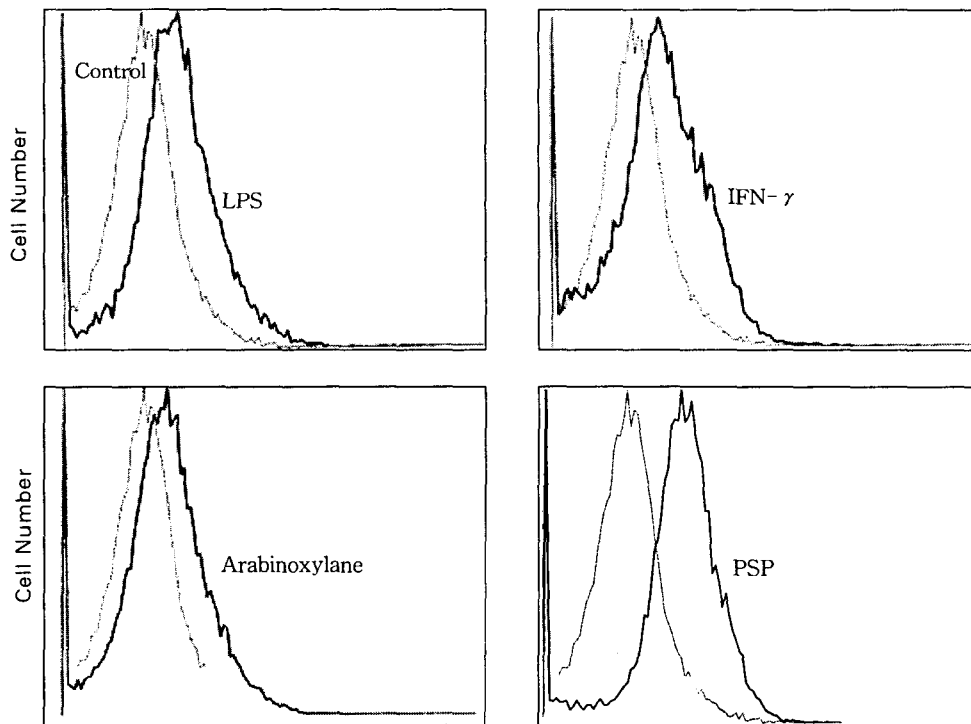


Fig. 6. Effects of arabinoxylane and PSP on the expression of MHC class II.

RAW264.7 cells (1×10^7 cells/well) were stimulated for 2 days, respectively, with arabinoxylane (1,000 $\mu\text{g/mL}$) and PSP (1,000 $\mu\text{g/mL}$) and assayed for MHC class II expression. FITC conjugated anti-I-A^d mAb was added to the cells and assayed with flow cytometry. Fluorescent profiles of the cells stained with FITC-anti-MHC class II (solid line) and IgG subclass-matched control mAb (dotted line) were shown.

있는데, 田尺 등(31)은 이들에 대해서 간국소의 면역기능을 높이는 간전이 재발의 예방적 치료법을 검토하였다. 암세포 전이 형성과정에 BRM의 효과는 암세포가 natural killer cell, killer cell, 활성화 대식세포 등으로부터 공격을 받고, 또한 국소에 존재하는 면역담당 세포를 총동원하도록 함으로써 암세포의 착상, 증식을 저지하는 것으로 설명하고 있다.

담자균에서 추출한 다당류의 항암효과에 관한 연구로는 Tsukagoshi 등(32)이 *C. versicolor*의 자실체로부터 추출한 단백다당류(PS-K)가 S-180에 대한 항암효과가 있음을 밝혔으며, Chihara 등(33,34)이 *Lentinus edoses*의 자실체로부터 항암성 다당류를 추출하여 heteropolysaccharide라는 것을 밝히고, 항암능이 매우 뛰어난 중성다당류인 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan을 분리하여 구조를 밝혔다. 또한 *Lentinus edoses*의 자실체로부터 분리된 단백다당류가 sarcoma-180에 대해서 억제효과가 뛰어났다고 보고하였다.

선진국에서는 PSP(polysaccharideprotein)를 면역증강제로 실용화하여 상당한 규모로 신장되어 가고 있으며, 건강식품, 의약품 등의 개발이 활발한 추세이다. 북미 유럽에서는 고등균류의 자실체나 균사배양물에서 수종의 다당류 또는 단백다당류가 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 본 연구에 사용한 arabinoxylane 화합물은 미강에서 추출한 헤미셀룰로즈에 표코버섯균사체 배양물에서 분리한 효소를 작용시켜 생성된 식물성 다당류이며, PSP(polysaccharide-peptide)는 담자균류의 일종인 *Coriolus versicolor* Sov-1의 균사체에서 추출 정제하여 얻은 단백다당체 성분이다.

본 실험의 결과 PSP와 arabinoxylane은 면역강화(immuno-stimulant) 소재와 특수 식이용(노약자, 회복기환자, 면역결핍자) 소재로서 사용이 가능한 것으로 생각된다.

요 약

Arabinoxylane과 PSP는 농도 의존적으로 비장세포의 증식과 IFN- γ 생산을 유도하였으며 특히, PSP는 IL-2, IL-4, IL-10의 생산도 유도하였다. 그리고, 항체생산 세포수를 나타내는 PFC은 11~14%, 활성화된 T세포수를 나타내는 RFC은 9~30% 증가하였다. Arabinoxylane은 T세포의 증식을 유도하지 못하였지만, PSP는 높은 농도에서 T세포의 증식 반응을 유도하였다. Arabinoxylane과 PSP는 비장세포에서 분리한 B세포의 증식을 유도하였고, 대식세포의 탐식능은 약 20~22%정도 증가하였다. 그리고, 농도 의존적으로 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였으며, TNF- α 와 IL-6의 생산을 현저하게 유도하였다. 특히, PSP는 IL-1 β 의 생산도 유도하였다. 또한, 대식세포 표면의 구조적 적합 복합체 II(MHC Class II)의 발현을 유도하였다. 이상의 결과로 arabinoxylane과 PSP는 면역반응에 관여하는 T세포, B세포 그리고 대식세포의 다양한 활성을 유도하는 효과가 있는

것으로 생각되어 면역기능을 강화하는 소재와, 노약자나 회복기 환자 등을 위한 특수 식이용 소재로서 사용이 가능한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 이룸라이프 생명과학원의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Dibner M. 1995. *Biotechnology Guide USA*. Institute for Biotechnology Information.
2. 박영훈. 1996. 생명공학산업의 현황과 전망. *생명공학동향* 4 (3): 165-187.
3. Ghoneum M. 1999. NK immunorestitution of cancer patient by MGN-3, A modified arabinoxylan rice bran (study of 32 patients followed for up to 4 years). *American Academy of Anti-Aging Medicine* 1: 1-10.
4. William DG. 1998. MGN-3: Quite possibly the most powerful immune booster known to man. *Alternatives Health Conscious Individual* 7: 113-120.
5. Ghoneum M. 1998. Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylane from rice bran (MGN-3). *Int J Immunotherapy* XIV(2): 89-99.
6. Yang MM, Chen Z, Kwok JS. 1992. The anti-tumor effect of a small polypeptide from *Coriolus versicolor*. *Amer J Chinese Med* XX(3-4): 221-232.
7. Qian ZM, Xu MF, Tang PL. 1997. Polysaccharide peptide (PSP) restores immunosuppression induced by cyclophosphamide in rats. *Amer J Chinese Med* XXV(1): 27-35.
8. Ng TB. 1998. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *Gen Pharm* 30: 1-4.
9. Jeong SJ, Yee ST, Jo WS, Yu SH, Lee SH, Lim YJ, Yoo YH, Kim JM, Lee JD, Jeong MH. 2000. A novel factor isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates mouse B cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity* 68: 5132-5138.
10. Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Cho HW, Seo KI, Yee ST. 2000. Immunosuppressive effects of herbal plant extracts alloantigen reactive cell proliferation and cytotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1133-1138.
11. Cunningham AJ, Szemberg A. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cell. *Immunology* 14: 599-600.
12. Garvey JS. 1980. *Methods in Immunology*. WA Benjamin Inc., New York. p 449-450.
13. Yee ST, Kato T, Tamura T, Nariuchi H. 1994. Different requirements of CD3 cross-linkage for the activation of memory and naive CD8⁺ T cells. *Cellular Immunology* 157: 48-58.
14. Kato T, Morokata T, Igarashi O, Yee ST, Inobe M, Uede T, Azuma M, Okumura K, Nariuchi H. 1997. Costimulatory effect of IL-2 on the activation of naive, memory CD4⁺ T cells, and Th1 clone. *Cellular Immunology* 176: 50-58.
15. 小松靖弘, 小野尚彦, 安部千之. 1984. 食能の測定法-マウス腹腔細胞および *Candida parapsilosis* (CP)を用いて-. *炎症* 4: 379-380.
16. Yee SY, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK.

2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
17. 小松道侯. 1978. 気管支喘息における Histamineに関する研究. *アレルギー* 27: 67-74.
 18. Osmond DG, Rolink A, Melchers F. 1998. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today* 19: 65-68.
 19. Hayward AR, Chmura K, Cosyns M. 2000. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J Infect Dis* 182: 1001-1004.
 20. Chihara G, Hamuro H, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka K. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res* 30: 2776-2781.
 21. Minowata T, Ohnuma T, Moore GE. 1972. Brief communication: Rosette forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Nat Cancer Inst* 49: 891.
 22. Wybran J, Carr MC, Fudenberg HH. 1972. The human rosette forming cell as a marker of thymus-derived cell. *J Clin Invest* 51: 2537.
 23. 서순봉, 김기홍, 박용준. 1994. 의학 진균학. 대학서림, 서울. p 67-88.
 24. Wajant H, Grell M, Scheurich P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 10: 15-26.
 25. Svanborg C, Godaly G, Hedlun, M. 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 2: 99-105.
 26. Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human aveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 23: 217-230.
 27. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIIITA. *Science* 265: 106-109.
 28. Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, Obara M, Kobayashi M, Li YQ, Hosokawa M. 1998. Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer drugs* 9: 343-350.
 29. 水鳥裕. 1998. 今日の治療薬. 羊土社, 東京. p 147.
 30. 岩本光存欣. 1999. 免疫刺戟と癌豫防. 第2回日本代替療法學會講演要旨. p 20.
 31. 田澤賢次, 勝山新弥. 1994. 癌轉移 再發防止對刷る BRM応用一特に、大腸癌術後肝轉移予防について. *Biotherapy* 8: 1390-1397.
 32. Tsukagoshi S, Ohashi K. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* 65: 557-558.
 33. Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. 1970. Anti-tumour polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature* 225: 943-944.
 34. Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222: 687-688.

(2003년 9월 15일 접수; 2004년 1월 28일 채택)